

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-506210

第3部門第2区分

(43)公表日 平成6年(1994)7月14日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 D 493/08		B 9165-4C	
A 6 1 K 31/35	ADD	7431-4C	
	ADN	7431-4C	
B 0 1 D 15/08		8014-4D	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平4-508303	(71)出願人	メルク エンド カンパニー インコーポ レーテッド アメリカ合衆国、ニュー ジャーシー 07065、ローウエイ、イースト リンカー ン アヴェニュー 126
(86) (22)出願日	平成4年(1992)3月9日	(72)発明者	ヘイトコ、ピーター・エヌ アメリカ合衆国、ニュー・ジャーシー・ 07065、ローウエイ、メイン・ストリー ト・1811
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)9月8日	(72)発明者	ワイルドマン、アーサー・エス、ジュニア アメリカ合衆国、ニュー・ジャーシー・ 08836、マーティンスビル、ヒルクレス ト・ロード・33
(86)国際出願番号	PCT/US92/01864	(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)
(87)国際公開番号	WO92/16276		
(87)国際公開日	平成4年(1992)10月1日		
(31)優先権主張番号	668,831		
(32)優先日	1991年3月13日		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N L, SE), CA, JP, US		

(54)【発明の名称】 HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質の精製方法

(57)【要約】

分取高性能液体クロマトグラフィーを使用するHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質の精製方法、及び、HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質と医薬として許容される担体とを含む医薬組成物。

請求の範囲

1. (1) トリオルガノシリル、シアノオルガノシリルまたはポリスチレンージビニルベンゼン共重合体とオルガノシリルとから成るグループから選択された固定相で任意にコートされたシリカを充填するかまたは多孔質黒鉛炭素を充填した高性能液体クロマトグラフィーカラムに粗HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質の溶液を導入し、
(2) (a) アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、イソプロパノール、酢酸エチル、メチレンクロリドもしくはクロロホルムから成るグループまたはその混合物から選択された有機溶媒と、
(b) 任意に、水、またはリン酸もしくは酢酸から選択された水溶液と、から成る溶媒混合物で溶出させ、
(3) 溶出したHMG-C₆Aレグクターゼを有分画から溶媒混合物の約30~35%を除去し、
(4) HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質分画を含有する溶出分画を水で処理してHMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質を品出させる処理から成る粗HMB-C₆Aレグクターゼ阻害物質の精製方法、
2. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質がロバスタチン、

し乾燥して純度≥99.5%の生成物を得ることを特徴とする請求項1に記載の方法。

11. (1) トリオルガノシリル、シアノオルガノシリルまたはポリスチレンージビニルベンゼン共重合体とオルガノシリルとから成るグループから選択された固定相で任意にコートされたシリカを充填するかまたは多孔質黒鉛炭素を充填した高性能液体クロマトグラフィーカラムに粗HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質の溶液を導入し、
(2) (a) アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、イソプロパノール、酢酸エチル、メチレンクロリドもしくはクロロホルムから成るグループまたはその混合物から選択された有機溶媒と、
(b) 任意に、水、またはリン酸もしくは酢酸から選択された水溶液と、から成る溶媒混合物で溶出させ、
(3) 溶出したHMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質含有分画から溶媒混合物の約60~65%を除去してHMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質を品出させる処理から成る粗HMB-C₆Aレグクターゼ阻害物質の精製方法、
12. 99.5%以上の純度を有するHMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質または医薬として許容されるその塩、

シンバスタチン、アラバスタチン、フルバスタチンまたはメバスタチンから成るグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質がロバスタチンまたはシンバスタチンから選択されることを特徴とする請求項2に記載の方法、
4. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質がロバスタチンであることを特徴とする請求項3に記載の方法、
5. オクタデシルシラン固定相でコートされたシリカをカラムに充填することを特徴とする請求項3に記載の方法、
6. 溶媒混合物がアセトニトリルと水とから成ることを特徴とする請求項5に記載の方法、
7. 溶媒混合物が70%のアセトニトリルと30%の水とから成ることを特徴とする請求項6に記載の方法、
8. クロマトグラフィーの処理温度が15℃~60℃であることを特徴とする請求項7に記載の方法、
9. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質を含有する溶出分画から溶媒混合物の約1/3を除去することを特徴とする請求項8に記載の方法、
10. 更に、HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質を尹油

13. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質が、ロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンから成るグループまたは医薬として許容されるその塩から選択されることを特徴とする請求項12に記載の化合物、

14. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質がロバスタチンであることを特徴とする請求項13に記載の化合物、
15. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質がシンバスタチンであることを特徴とする請求項13に記載の化合物、
16. HMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質がアラバスタチンであることを特徴とする請求項13に記載の化合物、
17. 高性能液体クロマトグラフィーを含む方法で精製された純度99.5%以上を有するHMG-C₆Aレグクターゼ阻害物質、
18. 非毒性の治療有効量の請求項12に記載の化合物と医薬として許容される塩体を含む医薬組成物、
19. 非毒性の治療有効量の請求項12に記載の化合物を、胃腸管に再吸収されない形態で胆汁酸と結合し得る医薬として許容される無毒カチオン性ポリマー、及び、医薬として許容される塩体と共に含むことを特徴とする医薬組成物、

20. 非毒性の治療有効量の請求項12に記載の化合物を、

- (a) スクワレンシンターゼ阻害物質；
- (b) HMG-C_oAシンターゼ阻害物質；
- (c) スクワレンエポキシダーゼ阻害物質；
- (d) アロブコール；
- (e) ナイアシン；
- (f) ジェンフィプロジル；及び
- (g) クロフィブレート

から成るグループから選択された非毒性の治療有効量のコレステロール降下剤と共に含む医薬組成物。

精製には使用されていなかったと考えられる。

発明の詳細な説明

本発明は、純度99.5%以上の製品を得るための高性能液体クロマトグラフィーによるHMG-C_oAレグクターゼ阻害物質の精製方法に関する。本発明のHMG-C_oAレグクターゼ阻害物質はロバスタチン、シンバスタチン、アラバスタチン、フルバスタチン及びメバスタチンを包含するがこれらの物質に限定はされない。本発明のHPLC法は、99.5%以上の純度を得るための再結晶化が不要であり、通常は結晶化だけを用いるという重要な利点を与える。更に、本発明のHPLC法は、唯1種類の有機溶媒によって行なうことができるので、溶媒循環の必要性も極めて少ない。

本発明の方法では順相HPLCまたは逆相HPLCのいずれを使用することも可能である。ロバスタチン及びシンバスタチンのようなテトラヒドロピラン環を有するHMG-C_oAレグクターゼ阻害物質の場合、逆相法が好ましい。カラム充填材は、アンコーテッドシリカ、コーテッドシリカまたは多孔質無機酸から成り得る。本文中で使用されたコーティングなる用語は、結合基の物理的結合及

明細書

HMG-C_oAレグクターゼ阻害物質の精製方法

発明の背景

安全で有効な医薬を製造するための重要な基準の1つは、高純度生成物を得ることである。ロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンのようなHMG-C_oAレグクターゼ阻害物質は最近紹介された新しい種類のコレステロール降下剤であり、血中コレステロール濃度を有効に低下させるが長期投与を必要とする。従って、HMG-C_oAレグクターゼ阻害物質を可能な最高純度で投与できるようにすることが特に重要である。

標準的な有機分子の精製方法は、何回もの再結晶化ステップを含み、多量の有機溶媒を使用する。再利用可能な溶媒による1回だけの結晶化を用いて、純度99.5%以上の生成物を得ることができ、しかも量産に適用可能であるような精製方法が切実に要望されている。

化合物純度の分析定量には高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)が普遍的に使用されている。大規模な工業生産調製物用HPLC(分取HPLC)は、タンパク質の分離及び精製のためには使用されてきたが、HMG-C_oAレグクターゼ阻害物質のような比較的小さい分子の大規模

び化学的結合の双方を包含する。

約85%以上の純度を有する粗HMG-C_oAレグクターゼ阻害物質を有機溶媒または有機溶媒と水との溶液に溶解する。有機または無機の塩によって混合物をpH2~9に緩衝してもよい。緩衝剤の例として、トリス-アセテートまたは酢酸/アンモニウムを挙げることができるが、使用できる緩衝剤はこれらの例に限定されない。得られた溶液をHPLCカラムに導入する。カラム充填材は整齊形でもよく不整齊形でもよい。充填材の直径は約1μm~約100μmの範囲でよい。好ましくは、充填材が不整齊のオクタデシルシランから成り、充填材の直径が約3μm~約30μmである。

カラム充填材としては、シリカ、オクタシルシラン、ジメチルシラン、オクタデシルシラン、シアノ-シランまたはポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体をオリガノシリル固定相と共に使用し得るが、これらの例に限定はされない。

カラム直径は5cm~80cmの範囲でよい。常用のカラム長さは約25cmである。必要に応じてカラムの長さは延長し得る。カラムを延長するためには、追加のカラム

を直列に結合するとよい。

通常は、以下の手順でコーテッドシリカまたはアンコーテッドシリカをカラムに充填する。充填剤をエタノール中でスラリー化する。次いでスラリーをカラムに移し、Dynamic Axial Compression (D.A.C.)[®]を用いて55バルで圧縮する。この手順は米国特許第3,996,609号及びフランス特許第73,07278号に記載されている。またはカラムを往方向に圧縮する。エタノールは移動相と共に排出される。充填後、分画を連続的に採取し、標準分析法によってこれらの分画を定量することによってカラムを試験する。

溶出剤としては、有機溶媒を用いるか、または、有機溶媒と水とを含み更にpH2～pH9の緩衝剤を含む溶媒を用いる。溶出剤は一般には、溶解用溶媒と同じ種類の溶媒または溶媒混合物であるが、必要な場合には異なる組成の溶出剤を使用し得る。好ましくは溶出剤が溶解用溶媒と同じ種類の有機溶媒とその水性混合物とを含む。所望の場合、HMG-CoAレグクターゼ阻害物質をカラムからより高速で溶出させるために移動相の勾配溶出を用いてもよい。クロマトグラフィー処理の温度として、使用溶媒に適した

温度を用いることができ、好ましくは約15℃～約60℃の範囲の温度を用いる。好ましい実施態様では、分離工程を通じて等温条件を維持する。HMG-CoAレグクターゼ阻害物質の検出は、分光学的手段によるが、蛍光もしくは屈折率を用いる別の物理的手段によってもよい。紫外線吸収または屈折率を用いる手段が好ましい。該当するHMG-CoAレグクターゼ阻害物質のピークを収集した後で、溶媒の一部を除去し、水溶液を添加して、HMG-CoAレグクターゼ阻害物質を品出させる。一般には、溶媒混合物の約1/3を除去し、水を使用してHMG-CoAレグクターゼ阻害物質を品出させる。または、溶媒混合物の約2/3を除去することによってHMG-CoAレグクターゼ阻害物質を品出させる。品出した阻害物質を次に再過し、乾燥すると、純度99.5%以上の生成物が採取率約90%で得られる。標準品に対する生成物の純度をHPLCによって決定する。収率は重量によって決定する。

文献に記載された当業者に周知の手順のいずれかによって粗HMG-CoAレグクターゼ阻害物質を調製する。充填剤として使用されるアンコーテッドまたはコーテッドシリカは市販商品である。充填剤として使用される多孔質シリカは市販商品である。充填剤として使用される多孔質シリカは市販商品である。充填剤として使用される多孔質シリカは市販商品である。

セトニトリルの残留量を減少させ得る。

医薬として許容される本発明化合物の塩は、ナトリウム、カリウム、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、亜鉛のようなカチオンから形成された塩、アンモニウム、エチレンジアミン、N-メチルピペリジン、ピペラジン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン及びテトラメチルアンモニウムヒドロキシドのような塩基から形成された塩を包含する。

本発明の精製化合物はまた、コレステロールの生合成の酵素経路を阻害するような別のコレステロール降下剤と混用投与してもよい。このようなコレステロール降下剤の非限定例としては、スクアレンシンセターゼ阻害物質、HMG-CoAシンセターゼ阻害物質及びスクアレンエポキシゲナーゼ阻害物質がある。このような阻害物質の代表例は、米国特許第5,053,425号、5,055,487号及び第5,026,554号に記載されたスクアレンシンセターゼ阻害物質である。投与可能な別のコレステロール降下剤

約炭素も充填済みカラムの形態で市販されている商品である。

溶解用溶媒または溶出剤として使用される有機溶媒は、アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、イソプロパノール、酢酸エチル、メチレンクロリド、クロロホルムまたはその混合物から選択される。有機溶媒/水混合物中の有機溶媒の割合は、約10%～約90%の範囲でよく、好ましくは65%～75%の範囲である。

本発明の目的は更に、純度99.5%以上を有する精製形態のHMG-CoAレグクターゼ阻害物質またはそれらの塩を提供することである。純度99.5%以上のロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンは本発明の目的の1つである。更に、純度99.5%以上のHMG-CoAレグクターゼ阻害物質またはその塩、特に純度99.5%以上のロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンを含有する医薬組成物も本発明に包含される。

必要な場合、実施例6で述べするように、精製したHMG-CoAレグクターゼ阻害物質を水性メタノールに溶解し、次いでそこから品出させることによって溶媒、特にア

の例としては、ナイアシン、アロブコール、フィブリック
アシッド (fibrilic acid)、クロフィブレート
及びジェンフィブロジル (gemfibrozil) がある。
成人の適正な日用量は夫々、ナイアシン2~8g、
アロブコール1000mg以下、クロフィブレート2g
以下及びジェンフィブロジル800~1500mgである。

本発明の化合物は更に、胆汁酸と結合して胃腸管に再吸
収されない形態になり得る医薬として許容される無毒カチ
オン性ポリマーと同時に投与され得る。このようなポリマー
の例は、コレステラミン、コレステボール及びポリメチル
-(3-トリメチルアミノプロピル)イミノ-トリメチレン
ジハライドである。本発明化合物とこれらのポリマーと
の相対量は1:100~1:15,000である。

実施例1

4.6gの粗ロバスタチンを200mlの70:30ア
セトニトリル/水に溶解し、これを、10 μ mの不斉形オ
クタデシルシランから成るHPLC充填材を充填した直径
5cm、長さ25cmのステンレススチールカラム(RG
1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA)に注入した。溶出

nmのUV吸収によって検出した。ロバスタチン分画は $K' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。ロバスタチンピークを収集し、
 $\leq 40^\circ\text{C}$ で減圧蒸留することによって1/3量を除去した。
水を添加してアセトニトリル濃度を25~30%にした。
ロバスタチンを濾過し、 $\leq 40^\circ\text{C}$ で真空乾燥した。純度 \geq
99.7%のロバスタチンを総収率 $\geq 90\%$ で回収した。

実施例3

4.6gの粗ロバスタチンを、200mlの70:30
アセトニトリル/0.02Mのトリス-アセテート(pH
7.5)で緩衝した水に溶解した。溶液を、10 μ mの不
斉形オクタデシルシランから成るHPLC充填材を充填し
た直径5cm、長さ25cmのカラム(RG1010-
C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA)に充填した。溶出剤は70:
30アセトニトリル/水であり、流速は約150ml/分
であった。254nmのUV検出を使用し、ロバスタチン
分画を265mlの量で収集した。ロバスタチンピークは
 $K' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。溶媒の1/3を除去する
ことによって、得られた溶液を濃縮した。約25~30%
のアセトニトリル濃度が得られるまで水を添加するとロバ

剤は70:30アセトニトリル/水であり、流速は約150
ml/分であった。254nmのUV検出を使用し、ロバ
スタチン分画を260mlの量で収集した。ロバスタチン
分画は $K' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。米国薬局方第22
版(p.1565:1990)に記載のように容量係数
 K' は保持時間に関連する。溶媒の1/3を除去すること
によって、得られた溶液を濃縮し、約25~30%のアセ
トニトリル濃度が得られるまで水を添加してロバスタチン
を晶出させた。濾過及び乾燥によって純粋ロバスタチン生
成物を回収した。純度99.7%w/wのロバスタチンを
総収率90%で回収した。

実施例2

濃度2.3g/100mlのロバスタチンを70%アセ
トニトリル/30%の0.02Mトリス-アセテート
(pH7.4)に溶解した。10 μ mの不斉形オクタデシ
ルシランを充填した直径5cm、長さ25cmのステンレ
ススチールカラム(RG1010-C18, The PQ
Corporation, Conshohocken, PA)に充填した。溶出剤は70%アセトニトリル/30
%水から成り、流速は約150ml/分であった。254

スタチンが晶出した。濾過及び乾燥によって純粋ロバスタ
チン生成物を回収した。純度99.7%w/wのロバスタ
チンを総収率91%で回収した。

実施例4

4.6gの粗ロバスタチンを、200mlの70:30
アセトニトリル/0.02Mのトリス-アセテート(pH
7.5)で緩衝した水に溶解した。溶液を、10 μ mの不
斉形オクタデシルシランから成るHPLC充填材を充填し
た直径5cm、長さ25cmのカラム(RG1010-
C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA)に充填した。溶出剤は70:
30アセトニトリル/水であり、流速は約150ml/分
であった。254nmのUV検出を使用し、ロバスタチン
分画を265mlの量で収集した。ロバスタチンピークは
 $K' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。溶媒の2/3を除去する
ことによって、得られた溶液を濃縮すると、ロバスタチン
が晶出した。濾過及び乾燥によって純粋ロバスタチン生成
物を回収した。純度99.7%w/wのロバスタチンを総
収率91%で回収した。

実施例5

實施例 6

國際調查報告

[illegible]

实例 7

实施例 8

環ロバスタチンの代わりに環アラバスタチンを使用し、実施例5に記載の手順と同様の手順を用いてアラバスタチンを純度99.5%以上の結晶形状に精製し得る。

[illegible]